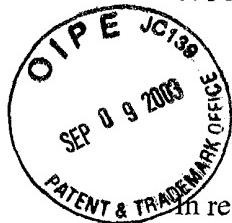


03560.003310

PATENT APPLICATION



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

TADASHI OKAMOTO ET AL.

Application No.: 10/601,777

Filed: June 24, 2003

For: A METHOD FOR ACQUIRING
INFORMATION OF A BIOCHIP USING
TIME OF FLIGHT SECONDARY ION MASS
APPARATUS FOR ACQUIRING
INFORMATION FOR THE APPLICATION
THEREOF

) Examiner: Not Yet Assigned

) Group Art Unit: 1645

) September 8, 2003

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

RECEIVED
SEP 10 2003
TC 1700

RECEIVED
SEP 11 2003
TC 1700

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

Sir:

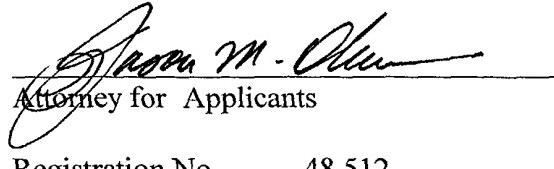
In support of Applicants' claim for priority under 35 U.S.C. § 119, enclosed
are certified copies of the following foreign applications:

2003-161862, filed June 6, 2003; and

2002-191208, filed June 28, 2002.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,



Attorney for Applicants

Registration No. _____ 48,512 _____

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

NY_MAIN 364858v1

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 6月28日
Date of Application:

出願番号 特願2002-191208
Application Number:

[ST. 10/C] : [JP2002-191208]

出願人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

2003年 7月10日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



【書類名】 特許願
【整理番号】 4686001
【提出日】 平成14年 6月28日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 5/00
G01N 33/50
【発明の名称】 飛行時間型二次イオン質量分析法によるバイオチップの
情報取得方法、および、その用途の情報取得装置
【請求項の数】 44
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会
社内
【氏名】 岡本 尚志
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会
社内
【氏名】 高瀬 博光
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会
社内
【氏名】 橋本 浩行
【特許出願人】
【識別番号】 000001007
【氏名又は名称】 キヤノン株式会社
【代理人】
【識別番号】 100088328
【弁理士】
【氏名又は名称】 金田 暢之
【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 飛行時間型二次イオン質量分析法によるバイオチップの情報取得方法、および、その用途の情報取得装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数の生体関連物質が基板表面上に配置されたバイオチップに関して、飛行時間型二次イオン質量分析法を用いて、該バイオチップ表面から情報取得する方法であって、

前記バイオチップの生体関連物質が配置される表面上の被測定領域の面積と比較して、より小さい面積のスポットサイズを有する一次イオンビームを、非連續的パターンでパルス的に前記バイオチップの表面に照射する工程、

前記パルス的に照射される一次イオンビームによって発生する二次イオンを飛行時間的に質量分析する工程、および

前記質量分析で得られる二次イオンの分析結果を、一次イオンビームのパルス的照射のパターンに基づいて、二次元的情報に再構成する工程を、少なくとも有することを特徴とするバイオチップの情報取得方法。

【請求項 2】 前記非連續的パターンは、二次元的にランダムなパターンに選択されていることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記非連續的パターンは、特定のプログラムされたパターンに選択されていることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 前記基板を構成する材料は、300Kにおける体積抵抗率が、 $10^{10} \text{ ohm} \cdot \text{cm}$ 以上の材料であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】 前記基板を構成する材料は、ガラスであることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記一次イオンビームのイオン種は、ガリウムイオンであることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】 前記一次イオンビームのイオン種は、セシウムイオンであることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】 前記一次イオンビームのエネルギーは、12KeV ~ 25K

eVの範囲に選択することを特徴とする請求項1～7のいずれか一項に記載の方
法。

【請求項9】 パルス的に照射される前記一次イオンビームのパルス周波数
は、1KHz～50KHzの範囲に選択することを特徴とする請求項1～8のい
ずれか一項に記載の方法。

【請求項10】 パルス的に照射される前記一次イオンビームのパルス幅は
、0.5ns～10nsの範囲に選択することを特徴とする請求項1～9のい
ずれか一項に記載の方法。

【請求項11】 前記一次イオンビームのスポットサイズは、直径を1μm
～10μmの範囲に選択することを特徴とする請求項1～10のいずれか一項に
記載の方法。

【請求項12】 前記被測定領域内における一次イオンビームのスキャンエ
リアは、直径50μm以上の円形、または、50μm×50μm以上の矩形の範
囲に選択することを特徴とする請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】 再構成される二次イオン像は、56個×56個以上のピク
セルからなる二次元画像に選択することを特徴とする請求項1～12のい
ずれか一項に記載の方法。

【請求項14】 該バイオチップ表面から情報取得が、一次イオンビームの
スキャンと、前記基板自体の位置的スキャンとを複合して行うことを特徴とする
請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】 前記基板自体の位置的スキャンのスキャンエリアは、直径
1mm以上の円形、または、1mm×1mm以上の矩形の範囲に選択することを
特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記生体関連物質は、核酸であることを特徴とする請求項
1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】 前記核酸として、DNA、RNAのいずれかが選択されているこ
とを特徴とする請求項16に記載の方法。

【請求項18】 DNAとして、オリゴデオキシヌクレオチド、ポリデオキシ
ヌクレオチド、cDNA（コンプリメンタリーDNA）のいずれかが選択されてい
るこ

とを特徴とする請求項17に記載の方法。

【請求項19】 前記生体関連物質は、PNA（ペプチド核酸）であることを特徴とする請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】 前記生体関連物質は、蛋白質であることを特徴とする請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】 前記生体関連物質は、該バイオチップの基板表面に共有結合によって結合されていることを特徴とする請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、核酸由来のリン酸バックボーンのフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことを特徴とする請求項16～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、 P^- 、 PO^- 、 PO_2^- 、または PO_3^- のいずれかを含むことを特徴とする請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、核酸塩基のフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことを特徴とする請求項16～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、(アデニン-H)⁻、(チミン-H)⁻、(グアニン-H)⁻、(シトシン-H)⁻、(ウラシル-H)⁻のいずれかを含むことを特徴とする請求項24に記載の方法。

【請求項26】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、ペプチドバックボーンのフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことを特徴とする請求項19または20に記載の方法。

【請求項27】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、アミノ酸残基のフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことを特徴とする請求項20に記載の方法。

【請求項28】 利用される飛行時間型二次イオン質量分析装置として、前

記基板を電気的に接地した状態で保持しつつ、測定がなされるリフレクトロン型TOF-SIMS装置を選択することを特徴とする請求項1～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】 複数の生体関連物質が基板表面上に配置されたバイオチップに関して、飛行時間型二次イオン質量分析法を用いて、該バイオチップ表面上に配置される生体関連物質の組成を分析する方法であって、

前記バイオチップの生体関連物質が配置される表面上の被測定領域の面積と比較して、よりも小さい面積のスポットサイズを有する一次イオンビームを、非連続的パターンでパルス的に前記バイオチップの表面に照射する工程、

前記パルス的に照射される一次イオンビームによって発生する二次イオンを飛行時間的に質量分析する工程、

前記質量分析で得られる二次イオンの分析結果を、一次イオンビームのパルス的照射のパターンに基づいて、二次元的画像に再構成する工程、

得られた二次元的画像中に含まれる必要な部分のマススペクト情報に基づき、該部分の生体関連物質の組成分析を行う工程とを
少なくとも有することを特徴とするバイオチップ表面の組成分析方法。

【請求項30】 前記非連続的パターンは、二次元的にランダムなパターンに選択されていることを特徴とする請求項29に記載の方法。

【請求項31】 前記非連続的パターンは、特定のプログラムされたパターンに選択されていることを特徴とする請求項29に記載の方法。

【請求項32】 前記生体関連物質は、核酸であることを特徴とする請求項29～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】 前記核酸として、DNA、RNAのいずれかが選択されていることを特徴とする請求項32に記載の方法。

【請求項34】 DNAとして、オリゴデオキシヌクレオチド、ポリデオキシンヌクレオチド、cDNA（コンプリメンタリーDNA）のいずれかが選択されていることを特徴とする請求項33に記載の方法。

【請求項35】 前記生体関連物質は、PNA（ペプチド核酸）であることを特徴とする請求項29～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】 前記生体関連物質は、蛋白質であることを特徴とする請求項29～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】 前記生体関連物質は、該バイオチップの基板表面に共有結合によって結合されていることを特徴とする請求項29～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、核酸由来のリン酸バックボーンのフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことを特徴とする請求項32～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、 P^- 、 PO^- 、 PO_2^- 、または PO_3^- のいずれかを含むことを特徴とする請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、核酸塩基のフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことを特徴とする請求項32～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項41】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、(アデニン-H) $^-$ 、(チミン-H) $^-$ 、(グアニン-H) $^-$ 、(シトシン-H) $^-$ 、(ウラシル-H) $^-$ のいずれかを含むことを特徴とする請求項40に記載の方法。

【請求項42】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、ペプチドバックボーンのフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことを特徴とする請求項35または36に記載の方法。

【請求項43】 前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、アミノ酸残基のフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことを特徴とする請求項36に記載の方法。

【請求項44】 複数の生体関連物質が基板表面上に配置されたバイオチップについて、飛行時間型二次イオン質量分析法を用いて、該バイオチップ表面から情報取得するための装置であって、

前記バイオチップの生体関連物質が配置される表面上の被測定領域の面積と比

較して、よりも小さい面積のスポットサイズを有する一次イオンビームを、非連続的パターンでパルス的に前記バイオチップの表面に照射する手段、

前記パルス的に照射される一次イオンビームによって発生する二次イオンを飛行時間的に質量分析する手段、および

前記質量分析で得られる二次イオンの分析結果を、一次イオンビームのパルス的照射のパターンに基づいて、二次元的情報に再構成する手段を、少なくとも具えていることを特徴とするバイオチップ表面の情報取得装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、複数の生体関連物質を基板上にマトリクス状に配置した、所謂、バイオチップ表面の各マトリクスのイメージング、および、各マトリクスの組成分析に関する。

【0002】

【従来の技術】

DNAチップ、プロテインチップ等、各種のプローブ分子を基板上にマトリクス状に配置したもの、所謂、バイオチップは、ゲノム解析、あるいは、遺伝子の発現解析などの目的に利用されるようになってきた。また、それらバイオチップを利用した解析の結果は、癌、遺伝病、生活習慣病、感染症等の診断、予後予想、治療方針の決定等に重要な指標を提供するものと期待されている。

【0003】

バイオチップの作製方法には、幾つかの手法が知られている。DNAチップを例にとって説明すると、フォトリソグラフィーを用いて、直接基板上にDNAプローブを逐次的に合成していく方法（米国特許第5405783公報等）、あるいは、予め合成したDNA、または、cDNA（コンプリメンタリ-DNA）を、基板上に供給し結合する方法（米国特許第5601980公報、特開平11-187900号公報、Science Vol. 270, 467, 1995等）が代表的なDNAチップの作製法である。

【0004】

一般的には、前記二種の方法によってバイオチップは作製されるが、作製されたバイオチップを先に述べた用途に使用しようとする場合、解析の信頼性、すなわち、定量性、再現性を保証するためには、各マトリクスに存在するプローブ、すなわち、プローブを利用する生体関連物質の量、つまり、密度を知ることが重要である。また、実際にどのようなマトリクス形状（形状、サイズ、状態）で存在するかを知ること（イメージング）も、やはり、定量性、再現性の確保といった見地から重要である。さらに、後述するように、チップ作製に利用される基板に、マトリクスの位置を明示するための物理的アドレスを設けていない場合、例えば、インクジェット法によってプローブ溶液を微小な液滴として供給するような手法でバイオチップを作製した際、物理的アドレスがないため、検出の手段によつては、バイオチップ上のどのプローブ部分を分析しているか、判断に迷うという問題をかかえることにもなる。その場合、採用している検出手段そのものが、マトリクス位置の顕影化を可能とするものであることが必要となる。

【0005】

しかし、バイオチップ上のプローブは、原理的には单分子膜レベルとされており、基本的に、マトリクス位置の顕影化を含めた生体関連物質の分析には、きわめて高感度な表面解析技術が必要となる。

【0006】

前記の要件を満足する高感度な表面解析技術の一つとして、プローブ自体にアイソトープラベルを施す方法が知られてはいるが、ラベル化の手法が煩雑であり、利用されるアイソトープラベル自体、被爆源となる危険性を有し、そのため、特殊な施設、装置が必要等の理由で、汎用性の観点で難点を有している。

【0007】

別の方法として、プローブを蛍光標識する方法、または、プローブと特異的に結合する物質に蛍光標識を施し、これとプローブを結合させる方法、すなわち、DNAチップにおいては、蛍光ハイブリダイゼーション法が考えられる。しかしながら、標識を利用する蛍光色素の安定性、蛍光クエンチング、あるいは、蛍光色素の基板表面への非特異的吸着、さらには、特異的結合（ハイブリダイゼーション）の定量性（安定性、再現性）等、高い定量性を達成する上では、種々の問題

が存在しており、プローブ自体の存在量を定量的に把握するには、なお課題が残る。

【0008】

その他、一般的な検出対象に利用可能な高感度表面分析手段として、FT-IR（フーリエ変換赤外分光）法を用いたATR法、XPS（X線光電子分光）法等があるが、いずれも、生体関連物質である、バイオチップのプローブの定量的分析、あるいは、イメージングには十分な感度を有しているとはいえない。特に、バイオチップの作製用基板として、一般的なガラスを用いる場合には、例えば、FT-IR（ATR）法では、基板のガラス自体に起因する吸収の影響、また、XPS法では、ガラス自体は絶縁性材料であるため、チャージアップの影響等があり、有効な分析手段とはいえない。

【0009】

また、生体関連物質に利用可能な、別の高感度表面分析手段として、レーザー共鳴イオン化法（RIS：Resonance Ionization Spectroscopy）によるDNAの検出方法が、米国特許第5821060公報に開示されている。この方法では、試料表面から放出される注目元素のイオン化エネルギーに相当する波長のレーザービームを照射して、当該元素をイオン化し検出するものである。その際、試料表面から元素を放出させる手段としては、レーザービームを用いる方式、イオンを用いる方式が開示されているが、特定元素の検出しかできないという技術的な制約を持つ。

【0010】

さらに、他の高感度表面分析手段としては、動的二次イオン質量分析法（dynamic-SIMS）があるが、この手法では、二次イオンを生成する過程で、有機化合物を小さいフラグメントイオン、または粒子にまで分解している。そのため、質量スペクトルから得られる化学構造情報は多くなく、例えば、構成する塩基は共通した四種しかない核酸関連物質のような有機物の分析には、得られる情報は不十分であり、汎用的に利用するには適していない。

【0011】

これに対して、同じく二次イオン質量分析法の一手法として知られている、飛

行時間型二次イオン質量分析（TOF-SIMS）法は、固体試料の最表面にどのような原子または分子が存在するかを調べるための分析方法であり、下記する特長を持つ。すなわち、 10^9 atoms/cm^2 （最表面1原子層の $1/10^5$ に相当する量）の極微量成分の検出能があること、有機物、無機物のどちらにも適用できること、表面に存在するすべての元素や化合物を測定できること、試料表面に存在する物質からの二次イオンのイメージングが可能であることである。

【0012】

以下に、この飛行時間型二次イオン質量分析法の原理を簡単に説明する。

【0013】

高真空中において、高速のイオンビーム（一次イオン）を固体試料表面に照射すると、スパッタリング現象によって表面の構成成分が真空中に放出される。この過程で発生する正または負の電荷を帯びたイオン（二次イオン）を、電場によって一方向に収束し、一定距離だけ離れた位置で検出する。スパッタの際には、試料表面の組成に応じて、様々な質量をもった二次イオンが発生するが、一定の電界中では、質量の軽いイオンほど早く、反対に重いイオンほど遅い速度で飛行する。そのため、二次イオンが発生してから、検出器に到達するまでの時間（飛行時間）を測定することで、発生した二次イオンの質量を分析することができる。

【0014】

一方、dynamic-SIMS法では、既に述べたように、イオン化の際、有機化合物は小さいフラグメントイオンまたは粒子にまで分解してしまうため、質量スペクトルから得られる化学構造情報、例えば、質量範囲は限定されるのに対し、TOF-SIMS法では、一次イオン照射量が著しく少ないため、有機化合物は化学構造を保った状態でイオン化され、幅の広い質量範囲で測定される質量スペクトルから有機化合物の構造をより直接的に知ることができる。加えて、固体試料表面の最も外側で発生した二次イオンのみが、真空中へ放出されるので、試料の最表面（深さ数Å程度）の情報を、選択的に得ることができる。

【0015】

前記測定原理を採用するTOF-SIMS装置には、大きく分けて、セクター型とリ

フレクトロン型のふたつのタイプがある。この二方式間の違いの一つは、被分析試料を固定するホルダの電気的な接地方法である。セクター型では、装置の機構上、固定ホルダに数 kV の正または負の電圧を印加することで、発生した二次イオンを質量分析計に導いているのに対し、リフレクトロン型では、固定ホルダは接地し、二次イオン引き出し電極に数 kV から数 10 kV の正または負の電圧を印加することで、二次イオンを質量分析計に導いている。

【0016】

TOF-SIMS法では、正の一次イオンが多用されるが、一次イオンの極性にかかわらず正の二次イオンと負の二次イオンが発生する。また、一次イオンの極性に依らず、一般的な測定条件では、一次イオンの照射により二次電子が発生し、二次電子の発生量は一次イオン量に比べて多量であるために、結果として、被分析試料の表面は正に帯電し易く、この帯電電荷が過剰（所謂、チャージアップ状態）になると、定量的な測定に支障をきたすことになる。このチャージアップに関して、装置構成を考えると、セクター型装置を用いて、絶縁物の負の二次イオンを測定する場合に、最も大きく正に帯電し得るといえる（発生した二次電子がすべて、上記の正電圧を印加した二次イオン引き出し電極に向かってしまうため）。

【0017】

上記チャージアップの正帯電を中和するため、セクター型、リフレクトロン型の両タイプとも、帯電中和用のパルス型電子銃を装備することが多い。このパルス型電子銃による、具体的な帯電中和方法は、一次イオン（サブ～数 nsec パルス）照射、正または負の二次イオンの飛行時間計測を行った後、次の一次イオンパルスを照射するまでの間に、上記パルス型電子銃からの電子線を被分析試料に一定時間照射する工程を設けるものである。なお、パルス型電子線から電子線を被分析試料に照射する間は、セクター型においては、試料ホルダへの電圧印加、また、リフレクトロン型においては、二次イオン引き出し電極への電圧印加とともに停止され、それぞれ接地される。

【0018】

この帯電中和方法により、チャージアップした正帯電は緩和され（若しくは解

消し）、絶縁物の分析が可能となることが多い。なお、セクター型装置を使った絶縁物の測定で、負の二次イオンを測定する場合に、最も大きく正に帯電し易いため、帯電中和のマージンは、この測定形態が最も狭い。いずれにしても、チャージアップを回避するには、當時、試料ホルダが電気的に接地されているリフレクトロン型装置を使う方が、セクター型装置を使うよりも（一般的には）有利である。特に、被分析試料の導電率が低い場合（抵抗率が高い、もしくは、誘電率が高いと言い換えることができる）、例えば、ガラス等の場合には、リフレクトロン型装置の方が、定量的な測定に適しているといえる。

【0019】

【発明が解決しようとする課題】

さて、リフレクトロン型であり、セクター型であり、TOF-SIMS法は、極めて感度の高い分析方法であるため、チャージアップの影響が少ない被分析試料、例えば、導電性に優れた金基板上に単分子膜レベルで形成されたオリゴヌクレオチドを分析することが可能である（Proceeding of the 12th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry 951, 1999）。また、本発明者らによる検討では、チャージアップ防止操作をすることにより、例えば、ガラス基板のような誘電率の高い基板表面に結合された、例えば、オリゴヌクレオチドなどの生体関連物質であっても、個別的なスポット測定を行う際には、例えば、一次イオンを直徑数 μm 程度で照射して、その場で分析することが可能である。

【0020】

しかしながら、本発明者らによる検討では、抵抗率が高い基板を用いて、ある程度広い領域、例えば、 $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ の範囲を、一次イオンビーム直徑 $5\mu\text{m}$ で、テレビ受像機の走査線のように、一定の方向に一次イオンビームを順次スキャン（ラスタースキャン）し、二次元的な二次イオン測定画像を得ようすると、チャージアップの影響が大きく、良好な画像を得ることができなかった。

【0021】

本発明は、前記の課題を解決するもので、本発明の目的は、抵抗率が高い基板上に固定されている生体関連物質に関して、ある程度広い領域に関して、TOF-SIMS法を利用して、その二次元的な二次イオン測定画像を得る際、チャージアッ

の影響を抑制して、定量性の良好な二次元的な測定画像を得ることを可能とする測定方法を提供することにある。

【0022】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題、すなわち、TOF-SIMS法を利用して、比較的抵抗率の高い基板上に生体関連物質が形成されたバイオチップの、比較的面積の大きな部分の二次元的なイメージングを行う際、チャージアップの影響を抑制する手段について、鋭意検討した結果、一次イオンビームをスポット照射する際、その照射スポットを、パルス的とし、さらに、非連続的なパターンで移行しつつ、二次イオン測定を進め、最終的に、前記非連続的なパターンに従って、二次イオン測定結果を二次元的なイメージ画像へと再構成することで、十分に高い位置分解能を有する二次元的なイメージ測定画像が得られることを見出した。本発明者らは、前記の離散的なパターンに従って、一次イオンビームをパルス照射すると、帯電中和が若干不足するスポット部分があっても、それに隣接するスポット点の測定がなされるまでの間に、チャージアップ状態の解消がなされ、結果として、二次イオン測定に実質的な影響を及ぼさないことを確認し、これらの知見に基づき、本発明を完成するに至った。

【0023】

すなわち、本発明にかかるバイオチップの情報取得方法は、複数の生体関連物質が基板表面上に配置されたバイオチップに関して、飛行時間型二次イオン質量分析法を用いて、該バイオチップ表面から情報取得する方法であって、

前記バイオチップの生体関連物質が配置される表面上の被測定領域の面積と比較して、より小さい面積のスポットサイズを有する一次イオンビームを、非連続的パターンでパルス的に前記バイオチップの表面に照射する工程、

前記パルス的に照射される一次イオンビームによって発生する二次イオンを飛行時間的に質量分析する工程、および

前記質量分析で得られる二次イオンの分析結果を、一次イオンビームのパルス的照射のパターンに基づいて、二次元的情報に再構成する工程を、少なくとも有

することを特徴とするバイオチップの情報取得方法である。

【0024】

その際、前記非連続的パターンは、二次元的にランダムなパターンに選択されていることが好ましい。あるいは、前記非連続的パターンは、特定のプログラムされたパターンに選択されているものとできる。

【0025】

本発明にかかるバイオチップの情報取得方法は、前記基板を構成する材料は、300Kにおける体積抵抗率が、 $10^{10} \text{ ohm} \cdot \text{cm}$ 以上の材料である際に好適な方法である。例えば、前記基板を構成する材料は、ガラスである際に、好適に適用できる方法である。

【0026】

本発明にかかるバイオチップの情報取得方法では、前記一次イオンビームのイオン種として、ガリウムイオンを利用することができます。あるいは、前記一次イオンビームのイオン種として、セシウムイオンを利用することもできる。さらには、Auイオン、もしくは、Auの多原子イオンを利用することもできる。また、前記一次イオンビームのエネルギーは、12KeV～25KeVの範囲に選択することが好ましい。

【0027】

さらに、パルス的に照射される前記一次イオンビームのパルス周波数は、1KHz～50KHzの範囲に選択することが好ましい。なお、パルス的に照射される前記一次イオンビームのパルス幅は、0.5ns～10nsの範囲に選択することが好ましい。

【0028】

一方、前記一次イオンビームのスポットサイズは、直径を $1\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ の範囲に選択することが望ましい。また、前記被測定領域内における一次イオンビームのスキャンエリアは、直径 $50\mu\text{m}$ 以上の円形、または、 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ 以上の矩形の範囲に選択することができる。

【0029】

一方、本発明にかかるバイオチップの情報取得方法では、再構成される二次イ

オン像は、56個×56個以上のピクセルからなる二次元画像に選択することが望ましい。加えて、該バイオチップ表面から情報取得が、一次イオンビームのスキャンと、前記基板自体の位置的スキャンとを複合して行うこともできる。その際には、例えば、前記基板自体の位置的スキャンのスキャンエリアは、直径1m以上の大円形、または、1mm×1mm以上の矩形の範囲に選択することが可能である。

【0030】

本発明にかかるバイオチップの情報取得方法は、前記生体関連物質は、核酸である場合に有効である。例えば、前記核酸として、DNA、RNAのいずれかが選択されていることができる。また、該DNAとして、オリゴデオキシヌクレオチド、ポリデオキシヌクレオチド、cDNA（コンプリメンタリー-DNA）のいずれかが選択されている場合にも、好適な方法となる。さらには、前記生体関連物質は、PNA（ペプチド核酸）である場合にも、同じく有効である。さらには、前記生体関連物質は、蛋白質である場合にも、好適に利用可能である。一方、前記生体関連物質は、該バイオチップの基板表面に共有結合によって結合されていることがより好ましい。

【0031】

前記の核酸を対象とする際には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、核酸由来のリン酸バックボーンのフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことができる。より具体的には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、 P^- 、 PO^- 、 PO_2^- 、または PO_3^- のいずれかを含むことができる。同時に、核酸あるいはPNAを対象とする際には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、核酸塩基のフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことが好ましい。より具体的には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、（アデニン-H） $^-$ 、（チミン-H） $^-$ 、（グアニン-H） $^-$ 、（シトシン-H） $^-$ 、（ウラシル-H） $^-$ のいずれかを含むことが望ましい。

。

【0032】

前記PNAあるいは蛋白質を対象とする際には、前記一次イオンビームによつて発生する二次イオン種は、少なくとも、ペプチドバックボーンのフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことができる。特に、蛋白質を対象とする際には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、アミノ酸残基のフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことが望ましい。

【0033】

本発明にかかるバイオチップの情報取得方法においては、利用される飛行時間型二次イオン質量分析装置として、前記基板を電気的に接地した状態で保持しつつ、測定がなされるリフレクトロン型TOF-SIMS装置を選択することがより好ましい。

【0034】

さらには、本発明にかかるバイオチップ表面の組成分析方法は、複数の生体関連物質が基板表面上に配置されたバイオチップに関して、飛行時間型二次イオン質量分析法を用いて、該バイオチップ表面上に配置される生体関連物質の組成を分析する方法であつて、

前記バイオチップの生体関連物質が配置される表面上の被測定領域の面積と比較して、よりも小さい面積のスポットサイズを有する一次イオンビームを、非連続的パターンでパルス的に前記バイオチップの表面に照射する工程、

前記パルス的に照射される一次イオンビームによって発生する二次イオンを飛行時間的に質量分析する工程、

前記質量分析で得られる二次イオンの分析結果を、一次イオンビームのパルス的照射のパターンに基づいて、二次元的画像に再構成する工程、

得られた二次元的画像中に含まれる必要な部分のマススペクト情報に基づき、該部分の生体関連物質の組成分析を行う工程とを少なくとも有することを特徴とするバイオチップ表面の組成分析方法である。

【0035】

その際、前記非連続的パターンは、二次元的にランダムなパターンに選択されていることが好ましい。あるいは、前記非連続的パターンは、特定のプログラム

されたパターンに選択されているものとできる。

【0036】

本発明にかかるバイオチップ表面の組成分析方法は、前記生体関連物質は、核酸である場合に有効である。例えば、前記核酸として、DNA、RNAのいずれかが選択されていることができる。また、該DNAとして、オリゴデオキシヌクレオチド、ポリデオキシヌクレオチド、cDNA（コンプリメンタリーDNA）のいずれかが選択されている場合にも、好適な方法となる。さらには、前記生体関連物質は、PNA（ペプチド核酸）である場合にも、同じく有効である。さらには、前記生体関連物質は、蛋白質である場合にも、好適に利用可能である。一方、前記生体関連物質は、該バイオチップの基板表面に共有結合によって結合されていることがより好ましい。

【0037】

前記の核酸を対象とする際には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、核酸由来のリン酸バックボーンのフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことができる。より具体的には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、 P^- 、 PO^- 、 PO_2^- 、または PO_3^- のいずれかを含むことができる。同時に、核酸あるいはPNAを対象とする際には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、核酸塩基のフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことが好ましい。より具体的には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、（アデニン-H） $-$ 、（チミン-H） $-$ 、（グアニン-H） $-$ 、（シトシン-H） $-$ 、（ウラシル-H） $-$ のいずれかを含むことが望ましい。

【0038】

前記PNAあるいは蛋白質を対象とする際には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、ペプチドバックボーンのフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むことができる。特に、蛋白質を対象とする際には、前記一次イオンビームによって発生する二次イオン種は、少なくとも、アミノ酸残基のフラグメント化、および、イオン化に基づくものを含むこと

が望ましい。

【0039】

加えて、本発明は、上述するバイオチップ表面から情報取得方法に利用可能な装置の発明をも提供し、すなわち、本発明にかかるバイオチップ表面の情報取得装置は、

複数の生体関連物質が基板表面上に配置されたバイオチップに関して、飛行時間型二次イオン質量分析法を用いて、該バイオチップ表面から情報取得するための装置であって、

前記バイオチップの生体関連物質が配置される表面上の被測定領域の面積と比較して、よりも小さい面積のスポットサイズを有する一次イオンビームを、非連続的パターンでパルス的に前記バイオチップの表面に照射する手段、

前記パルス的に照射される一次イオンビームによって発生する二次イオンを飛行時間的に質量分析する手段、および

前記質量分析で得られる二次イオンの分析結果を、一次イオンビームのパルス的照射のパターンに基づいて、二次元的情報に再構成する手段を、少なくとも具えていることを特徴とするバイオチップ表面の情報取得装置である。

【0040】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明をより詳細に説明する。

【0041】

本発明の方法では、T O F - S I M S を用いて画像取得を行うにあたって、一次イオンのパルス照射を、上記のラスタースキャンではなく、非連続的パターンに基づいて行い、得られたそれぞれのパルス照射による質量分析の結果を、一次パルス照射のパターンに基づいて再構成して画像化することを特徴としている。この非連続的パターンによるスキャンの手法により、比較的抵抗率の高い基板状に生体関連物質が形成されたバイオチップの、比較的面積の大きな部分のイメージングが可能となる。

【0042】

スキャンの非連続的パターンは、原則的にはチャージアップの影響を排除可能

であればいかのようなパターンでもかまわなく、そのような例としては、ランダムなパターン、あるいは、特定のプログラムされたパターンをあげることができる。このような場合、一次イオン照射される（ビーム形状と同一形状を有する）単位部分（以下ピクセル）は最終的に隣接するピクセルと重なり合っても差し支えないが、同一部分が同一回のスキャンで複数回照射されると、得られたデータが実際の数値を反映しないことになり、好ましくない。すなわち、仮に、ランダム・パターン発生にコンピューター上で乱数を用いる場合、使用する範囲で一様な発生確率を有する乱数を使用することが望ましい。また、場合により上記のように適宜プログラムされ特定のパターンを使用することができる。

【0043】

このようにして取得された各ピクセルのマススペクトルにより画像を形成しようとする場合、一次イオンのスキャンを非連続的、すなわち、ランダム、あるいは、特定のプログラムされたパターン等によって行うので、データを得られた順に再構成すると、実際を正しく反映して画像を得ることができない。このような場合、本発明では、一次イオンの照射パターンを記憶し、得られたデータを、これら記憶されたパターンに基づいて再構成して、実際を正しく反映した画像を得る。

【0044】

本発明における、非連続的一次イオン照射とその再構成は、チャージアップに大きく影響される、主として抵抗率の高い基板を用いた場合にきわめて有効であって、逆に、通常のラスタースキャンでもイメージング可能な抵抗率の低い基板を用いる場合には、非連続スキャンでは、データの再構成に、ラスタースキャンに比べると長い時間を必要とするので、却って、現実的には、その利点が十分に発揮できないこともある。その利点を発揮する上では、使用する基板の抵抗率によって適宜スキャン方法を選択すればよい。例えば、基板材料としては、非連続的なスキャンが特に有効な抵抗率の範囲は、体積抵抗率で $10^{10} \text{ ohm} \cdot \text{cm}$ （300K）以上である。

【0045】

バイオチップの基板として、好適に使用されるガラス基板の体積抵抗率は、約

10^{10} o h m · c m (300K) 以上であり、本発明の画像化方法を応用するには最も適している基板といえる。

【0046】

また、一次イオン種としては、イオン化効率、質量分解能等の観点からガリウムイオン、セシウムイオン、また、場合によってはAuイオン等が好適に用いられる。なお、Auイオンを用いると、極めて高感度の分析が可能となる点で好ましい。その際、Auイオンのみならず、 Au_2 イオン、 Au_3 イオンを用いることができ、この順で感度の上昇が図られる場合が多く、さらに好ましい形態となる。

【0047】

TOF-SIMSを用いてイメージングを行う場合には、質量分解能、分析面積、分析時間は、一次イオンパルス周波数、一次イオンビームエネルギー、一次イオンパルス幅と、画像処理に利用されるコンピューターのデータハンドリング能力と相互に密接に関係して一義的には簡単に決まらない。しかしながらそれぞれの値は分析可能であるという観点からある範囲であることが必要となる。

【0048】

それらの観点から、本発明では一次イオンビームパルス周波数が1 KHzから50 KHzの範囲であることが望ましく、また、一次イオンビームエネルギーが12 KeVから25 KeVの範囲であること、さらには、一次イオンビームパルス幅が0.5 nsから10 nsの範囲であることが望ましい。

【0049】

また、本発明は、高い分解能を有する質量スペクトルによるイメージング、あるいは、後述のように、イメージングから高い質量分解能を有する組成分析を可能とする形態とするため、望ましい高質量分解能を得ようすると、一次イオンビーム直径は、ある程度の大きさを必要とし、望ましくは $1\text{ }\mu\text{m}$ から $10\text{ }\mu\text{m}$ の範囲である。この範囲は、逆に本発明にかかる分析対象バイオチップの各マトリクス（ドット、あるいは、スポットともいう）のサイズが、通常、直径 $10\text{ }\mu\text{m}$ から $100\text{ }\mu\text{m}$ 、また、 $10\text{ }\mu\text{m} \times 10\text{ }\mu\text{m}$ から $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ であることを勘案すると好適であるといえる。

【0050】

スキャンのエリアは上述のように他の要因と関係するので、やはり一義的には決まらないが、直径 $50\text{ }\mu\text{m}$ から $500\text{ }\mu\text{m}$ 以上、あるいは、 $50\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ }\mu\text{m}$ から $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$ 以上であることが望ましい。

【0051】

一回の特定のスキャンが何個の一次イオンビームの照射数、すなわち、ピクセル数から構成されるかは、スキャンエリアサイズ、一次イオンビーム径、ピクセルが、どの程度重なる（オーバーラップ）か、また、一次イオン照射周波数、もしくは、一回のスキャン時間によって決まり、それらは、また、二次イオン像を構成するピクセル数を自動的に既定する。その意味からいって二次イオン像は $56\text{ 個} \times 56\text{ 個}$ から $1024\text{ 個} \times 1024\text{ 個}$ 以上のピクセルで構成されていることが望ましい。

【0052】

一般的に用いられているバイオチップの外形サイズは、例えば、 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 、 $1\text{ インチ} \times 1\text{ インチ}$ ($25.4\text{ mm} \times 25.4\text{ mm}$)、あるいは、スライドグラスサイズ（例えば、 $26\text{ mm} \times 76\text{ mm}$ ）であり、マトリクスは、その内部に配置されている。上述のスキャンエリアサイズではこれらのサイズにわたり、全てをイメージングすることはできない。そのような場合には、必要に応じて、一次イオンビームスキャンに加えて基板の位置的スキャン（一般的には基板を搭載したステージをスキャンするのでステージスキャンという）を併用して、より広い範囲のスキャンすることが望ましい。この場合、より広い範囲をスキャンしようとすると長い分析時間を必要とすることになるが、基板内の全面にマトリクスが配置されているわけではなく、従って必要に応じて分析エリアを選択することになるが、そのスキャンエリアとしては直径 1 mm 以上、または、 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ から直径 10 mm 以上、または、 $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ 以上であることが望ましい。

【0053】

これまで述べてきたように、本発明は。TOF-SIMSを用いたバイオチップのイメージングをその主眼とする。しかしながら、これを逆からみると、イメージングはTOF-SIMSで検出、測定、分析可能なフラグメントイオンの質

量データに基づく。すなわち、さらに別の面からみると、イメージングされたバイオチップの質量データの検出されている部分（もしくはピクセル）からは原理的にマススペクトルデータが抽出可能であることになる。本発明は、これらイメージングされ、位置が特定された部分の組成分析を包含する。これによって実際に製作されたバイオチップの特定の部分がイメージングされることにより、位置や形状が特定され、かつ、その部分の組成分析が可能となる。

【0054】

本発明によってイメージングされ、または、組成分析されるバイオチップに搭載され生体関連物質は本発明によるTOF-SIMS法によってイメージングされ、または、組成分析可能であるものであれば、特に限定されるものではなく、どのような物質であってもかまわないが、本発明者らの検討では、核酸、蛋白質であれば好適に分析し得る。核酸の例としては、オリゴデオキシヌクレオチド、ポリデオキシヌクレオチド、cDNA（コンプリメンタリーDNA）等のDNA、または、mRNA、tRNA、rRNA等のRNA、さらには、骨格がペプチドで構成されるPNA（ペプチド核酸）で代表される核酸アナログがあげられる。蛋白質の例としては、オリゴペプチド、ポリペプチド、酵素、抗体等を例としてあげることができる。

【0055】

これらの生体関連物質は、基板上にどのような様態で存在してもかまわないが、バイオチップ自体のバイオチップとしての使用様態（例えばDNAチップでいえばハイブリダイゼーション等）と、TOF-SIMSを用いての分析時の、例えばイオン化の安定性等を勘案すると、基板表面に共有結合によって結合しているものが望ましい。これら共有結合の方法には様々な方法が知られており、それらを適宜応用すればよい。共有結合方法の一例は、特開平11-187900号公報に記載されている。

【0056】

また、共有結合の一形態として固相上での核酸、蛋白質の逐次合成方法が知られており、本発明の方法が対象とする、バイオチップの作製方法としてそれらを用いてもかまわない。

【0057】

さらに、生体関連物質の基板への共有結合方法として、予め共有結合をするための官能基を有する、例えば、核酸、蛋白質を上記官能基と共有結合可能な官能基が形成された基板に供給し共有結合させる方法があり、これら基板への生体関連物質の供給方法としては、既知の方法であるピエゾジェット法、サーマルジェット法を代表とするインクジェット法を好適に用いることができる。特開平11-187900号公報には、サーマルジェット法によるDNAプローブの基板への供給方法についても記載がある。

【0058】

TOF-SIMSでバイオチップのイメージング、組成分析を行うためには、上記生体関連物質に特有のフラグメントイオンが二次イオンとして検出される必要があり、それは、生体関連物質に特有であり、かつ、TOF-SIMSで検出可能であれば、いかようなものであってもかまわない。

【0059】

以下に、生体関連物質と、それに特異的なフラグメントイオンについて限定的でない例をあげる。

【0060】

生体関連物質が核酸であれば、リン酸ジエステルからなるバックボーンを有するので、フラグメントイオンとしては上記リン酸バックボーンのフラグメントイオンであるP⁻、PO⁻、PO₂⁻、またはPO₃⁻のいずれをも好適に検出することができる。

【0061】

また、核酸には、それがDNAであれば、アデニン、チミン、グアニン、シトシン、RNAであればチミンの替わりにウラシルの、それぞれ4種の塩基を有する。また、代表的な核酸アナログであるPNAも4種の塩基、アデニン、チミン、グアニン、シトシンをもつので、これらの塩基のフラグメントイオン、すなわち、(アデニン-H)⁻、(チミン-H)⁻、(グアニン-H)⁻、(シトシン-H)⁻、(ウラシル-H)⁻を二次イオンとして利用することができる。

【0062】

また、PNAはバックボーンがペプチド結合で構成されているので、このペプチド結合のフラグメントイオンをTOF-SIMSの検出に好適に利用し得る。

【0063】

検出すべき生体関連物質が、蛋白質である場合も、PNAと同様にバックボーンはペプチド結合で構成されているので、ペプチド結合のフラグメントイオンを利用できる。また、ペプチド鎖を構成する、各アミノ酸残基由来のフラグメントイオンも利用可能である。なお、DNA、RNA、PNAを構成する核酸のヌクレオチド残基は、各4種であるのに対して、ペプチド鎖を構成するアミノ酸残基は、20種以上であり、その結果として1種の残基由来のマススペクトル強度が小さくなるので、検出の効率は低下することになる。

【0064】

本発明の情報取得方法において、二次元的なイメージング、および、組成分析における手段として利用するTOF-SIMS装置に関しては、検出、二次元イメージング、組成分析が可能な装置であれば、どのような型式の装置であってもかまわない。なお、既述のように、絶縁性材料を用いる際における、基板のチャージアップの影響をより効果的に低減する目的からは、常時、基板を固定するホルダーが電気的に接地されているリフレクtron型装置を利用することがより望ましい。

【0065】

【実施例】

以下に、実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。

【0066】

(実施例1)

dT40プローブによる核酸プローブチップの作製

特開平11-187900号公報に記載の方法に準じて、石英ガラス基板を利用して、核酸プローブチップを作製した。

【0067】

(1) 基板洗浄

25.4mm×25.4mm×1mmの合成石英基板をラックに入れ、純水で

10%に稀釀した超音波洗浄用洗剤（プランソン：GP III）に一晩浸した。その後、該洗剤中で20分間超音波洗浄を行い、その後、水洗により洗剤を除去した。純水ですすいだ後、純水の入った容器中でさらに超音波処理を20分間行った。次に、予め80℃に加温した1N水酸化ナトリウム水溶液に、この基板を10分間浸した。引き続き水洗、純水洗浄を行って、そのまま乾燥せず、洗浄済基板として、次工程に供した。

【0068】

(2) 表面処理

アミノ基を結合したシランカップリング剤、N-β-(アミノエチル)-γ-アミノプロピルトリメトキシシラン KBM603（信越化学工業）の1wt%水溶液を室温下で2時間攪拌し、該シラン化合物の分子内のメトキシ基を加水分解した。この溶液に、上記(1)で得た洗浄済基板を室温で1時間浸漬した後、純水で洗浄し、窒素ガスを基板の両面に吹き付けて乾燥させた。次に、基板を20℃に加熱したオーブン中で1時間ベークして、最終的に基板表面にアミノ基を導入した。

【0069】

次いで、N-マレイミドカプロイロキシスクシンイミド（同仁化学研究所：以下、EMCS）2.7mgを、ジメチルスルホキシド(DMSO)／エタノールの1:1(容量比)溶液に濃度が0.3mg/mlとなる様に溶解した。前記シランカップリング処理を行った石英基板を、このEMCS溶液中に室温で2時間浸漬して、シランカップリング処理によって基板表面に導入されているアミノ基と、EMCSのスクシイミド基を反応させた。この反応に伴い、基板表面にはEMCS由来のマレイミド基が存在することになる。EMCS溶液から引き上げた基板は、前記DMSO／エタノール混合溶媒、及びエタノールで順次洗浄した後、窒素ガスを吹き付けて乾燥させた。

【0070】

(3) プロープDNAの合成

DNA合成業者（ベックス）に依頼して、配列番号1の一本鎖核酸(dTの40量体)を合成した。なお、配列番号1の一本鎖DNAの5'末端には、合成時にチオ

ールモディファイア（グレンリサーチ）を用いて、スルファニル基（SH）を導入した。DNA合成後、脱保護、DNAの回収は定法により行い、また、精製には、HPLCを用いた。合成から精製までの一連の工程は、すべて合成業者に依頼して行った。

配列番号：1

$$5' - \text{HS} - (\text{CH}_2)_6 - \text{O} - \text{PO}_2 - \text{O} - \text{TTTTTTTTTT} \quad \text{TTTTT}$$

$$\text{TTTTT} \quad \text{TTTTTTTTTT} \quad \text{TTTTTTTTTT} \quad 3'$$

(4) サーマルジェットプリンターによるDNA吐出、および基板への結合

(3) に記載する配列番号 1 の一本鎖DNAを、最終濃度8 μMで、グリセリン7.5 wt %、尿素7.5 wt %、チオジグリコール7.5 wt %、アセチレンアルコール(商品名:アセチレノールEH;川研ファインケミカル(株)社製)1 wt %を含む溶液に溶解した。

[0071]

一方、サーマルジェット法の一種であるバブルジェット法を用いたバブルジェットプリンターBJF-850(キヤノン)用のプリンターヘッドBC-50(キヤノン)を、数 $100\mu l$ の溶液を吐出可能とするべく改造した。この改造を施したヘッドを、平板である石英基板上へ、インク吐出が可能となるよう改造した吐出描画機に搭載した。このヘッドの改造タンク部に、前記DNA溶液を数 $100\mu l$ 注入し、吐出描画機にEMCS処理基板を装着して、EMCS処理表面にスポットティングした。なお、スポットティング時の吐出量は $4\text{ p l} / \text{drop}$ で、スポットティングの範囲は、基板の中央部に $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ の範囲に、 200 dpi 、すなわち、 $127\mu\text{m}$ のピッチで吐出した。この条件ではスポットティングされたドットの直径は約 $50\mu\text{m}$ であった。

[0072]

スポットティング終了後、基板を30分間加湿チャンバー内に静置し、基板表面のマレイミド基と、核酸プローブ5'末端のスルファニル基（-SH）とを反応させ、DNAプローブを固定させた。次いで、基板を純水で洗浄し、純水中で保存した。DNA結合基板（DNAチップ）は、TOF-SIMSによる分析直前に窒素ガスを吹き付けて乾燥し、真空デシケーター中でさらに乾燥した。

【0073】

(実施例2)

TOF-SIMSによるイメージング、組成分析

(1) 実施例1で作製したDNAチップのイメージング、および、組成分析を ION TOF社製TOF-SIMS IV装置を用いて行った。

【0074】

以下に、測定に用いた装置、条件をまとめて示す。

【0075】

<一次イオン>

一次イオン：25 kV Ga⁺、ランダムスキャンモード

一次イオンのパルス周波数：2.5 kHz (400 μsec / shot)

一次イオンパルス幅：1 ns

一次イオンビーム直径：5 μm

<二次イオン>一次イオンの照射パターンについて再構成しイメージング

二次イオン検出モード：negative

測定領域：300 μm × 300 μm

二次イオンimageのpixel数：128 × 128

積算回数：256

(2) 測定結果

図1に、実施例1で作製したDNAチップについて、TOF-SIMS IV型装置で上記の測定条件に基づき分析し、得られたデータから代表的なイオン種についてイメージングを行った結果を示す。図1-1、1-2はそれぞれ、DNAのリン酸バックボーンのフラグメントイオンであるPO₂⁻、PO₃⁻イオンによるイメージング結果である。これらの二次元イメージ像に示すように、DNAチップ上にDNAがバブルジェットでスポットティングした形状（直径約50 μmのほぼ円形形状、ピッチ約125 μm）で存在していることが確認される。1種のフラグメントイオンによるイメージングだけではなく、図1-3に示すように、PO₂⁻イオンとPO₃⁻イオンの加算による二次元イメージングも可能である。

【0076】

リン酸バックボーンのフラグメントイオンの他にも、例えば、図1-4に示すように、核酸塩基由来のフラグメント $C_2H_5N_2O_2^-$ イオンによるイメージングも可能である。本実施例に使用したプローブDNAはチミジル酸のホモオリゴマーであるので、検出される核酸塩基由来のフラグメントイオンは、 $C_2H_5N_2O_2^-$ イオン、すなわち、(チミン-H) $^-$ イオンのみであった。

【0077】

図2に、得られたイメージング画像のドットの内部と外部の代表的な二次イオンに関する質量スペクトルプロファイルを示す。例えば、 SiH_3^+ イオンは、ドットの内部のDNAに特異的ではないので、ドットの内部、外部で同様に検出される。一方、DNAに特異的、すなわち、ドットの外部より存在確率の高い、 O_2^- 、 P^- 、 PO^- 、 PO_2^- 、 PO_3^- 、 CNO^- （核酸塩基由来）、 $C_2H_5N_2O_2^-$ の各イオンは、ドットの外部と比較して、ドットの内部で有意にイオン強度が強く検出されている。図2に示す結果より、本発明の方法を用いることで、マススペクトルにより二次元的なイメージングがなされ、位置が特定された部位の組成分析が可能であることがわかる。

【0078】

(実施例3)

4種塩基混在50量体プローブによる核酸プローブアレイの作製、ならびにそのイメージング、組成分析

(1) DNAチップの作製

実施例1に記載する手順と、全く同様な方法により、下記配列番号2のDNAを用いて、DNAチップを作製した。

配列番号：2

5' HS-(CH₂)₆-PO₂-O-TGCAGGCATG CAAGC
TTGGC ACTGGCCGTC GTTTACAAAC GTCTGTGAC
TG 3'

(2) TOF-SIMSによるイメージング、組成分析

実施例2に記載する測定条件、方法と全く同様な方法で、前記配列番号2のDNAからなるDNAチップに対して、イメージングと組成分析を行った。

【0079】

その結果、実施例2に示す、リン酸バックボーンのフラグメントイオン、(チミン-H)-イオンなどのフラグメントイオンに加えて、(アデニン-H)-、(グアニン-H)-、(シトシン-H)-の各フラグメントイオンによるイメージングと、組成分析が可能であった。

【0080】

(実施例4)

RNAチップの作製と、そのイメージングと組成分析

(1) RNAチップの作製

RNA分解酵素であるRNaseフリーな条件で、全ての作製工程を行うこと以外は、実施例1と全く同様な条件、手順で、配列番号3のRNA(U20)を用いて、RNAチップを作製した。

配列番号：3

5' HS-(CH₂)₆-O-PO₂-O-UUUUUUUUUU UUUUU
UUUUU 3'

(2) TOF-SIMSによるイメージング、組成分析

実施例2に記載する測定条件、方法と全く同様な方法で、前記配列番号3のRNAからなるRNAチップに対して、イメージングと組成分析を行った。なお、TOF-SIMS分析の直前まで、RNAチップ基板をRNaseフリーな条件に保った。

【0081】

その結果、実施例2と同様に、リン酸バックボーン由来のフラグメントイオンが検出された他に、(ウラシル-H)-イオンが検出され、イメージング、および、組成分析が可能であった。

【0082】

(実施例5)

PNAチップの作製と、イメージングと組成分析

(1) PNAチップの作製

実施例3で用いたDNAプローブと塩基配列が同一（配列番号：2'とする）

のPNAを、合成業者（ベックス）に依頼して合成した。なお、N末端（核酸における5'末端に対応）に、下記に示したリンカーを介して、アミノ酸の一種であるシスティンを結合した。システィンは、側鎖にSH基を有しているので、これを用いて、石英基板の表面処理後のマレイミド基と結合することが可能である。

【0083】

配列番号：2' のPNAを用いて、実施例1と同様な方法により、PNAチップを作製した。

配列番号：2'

N_yCys-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂CONH-TGCAGG
CATG CAAGCTTGGC ACTGGCCGTC GTTTTACAA
C GTCGTGACTG

(2) TOF-SIMSによるイメージング、組成分析

実施例2に記載する測定条件、方法と全く同様な方法で、前記配列番号2'のPNAからなるPNAチップに対して、イメージングと組成分析を行った。

【0084】

その結果、実施例3と同様に、PNAを構成する4種の塩基に由来する、(アデニン-H)⁻、(チミン-H)⁻、(グアニン-H)⁻、(シトシン-H)⁻の各フラグメントイオンによるイメージングと、組成分析が可能であった。なお、PNAには、リン酸バックボーンが存在しないので、リン酸バックボーンに由来するフラグメントイオンは検出されなかった。

【0085】

(実施例6)

蛋白質チップの作製と、イメージングと組成分析

(1) 蛋白質チップの作製

実施例1～5に示す、合成核酸プローブとは異なり、蛋白質を石英基板上に固定し、具体的には、市販（シグマーアルドリッヂジャパン）の牛胸腺アルブミン（BSA：蛋白質の一種）を用いて、蛋白質チップを作製した。なお、BSAには、システィン残基が含まれており、実施例5と同様に、このシスティンのSH

と基板表面のマレイミド基の反応により、基板上への結合を図った。

【0086】

実施例1と同様の方法により、該蛋白質溶液のスポットを行い、蛋白質チップを作製した。なお、バブルジェットによるBSAの吐出に関しては、利用する溶媒条件、BSA濃度などを適宜調整した。

【0087】

(2) TOF-SIMSによるイメージング、組成分析

二次イオンの検出モードを、positiveに選択する以外は実施例2と全く同様な方法、手順で、上記BSAを固定したチップのイメージングと組成分析を行った。

【0088】

その結果、幾つかのアミノ酸残基のフラグメントイオンによるイメージングと組成分析が可能であった。イメージングに利用される、代表的な二次イオン種は、Pro、Arg残基由来のフラグメントイオンと考えられるC₄H₈N⁺、および、Trp残基由来のフラグメントイオンと考えられるC₉H₈N⁺であった。

【0089】

(実施例7)

一次イオンをAu⁺とする以外は、実施例2と全く同様の方法で、実施例1で作製したDNAチップについて、イメージング、及び、組成分析を行った。その結果、実施例2で検出された各イオンに関して、約二桁感度の高い質量スペクトルと、それに基づいたイメージングが可能となった。

【0090】

(実施例8)

一次イオンをAu₃⁺とする以外は、実施例3と全く同様の方法で、DNAチップのイメージング、及び、組成分析を行った。その結果、実施例3で検出された各イオンに関して、二桁から、三桁感度の高い質量スペクトルと、それに基づいたイメージングが可能となった。

【0091】

【発明の効果】

本発明の方法により、比較的誘電率の高い基板上に単分子膜レベルで形成された生体関連物質からなる、所謂、バイオチップに関して、チャージアップの影響を排除して、飛行時間型二次イオン質量分析による定量性に優れた二次元イメージング、さらには、組成分析が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

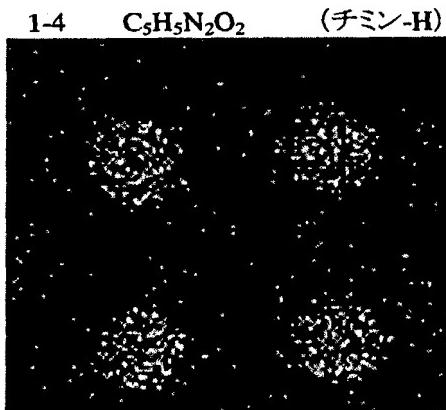
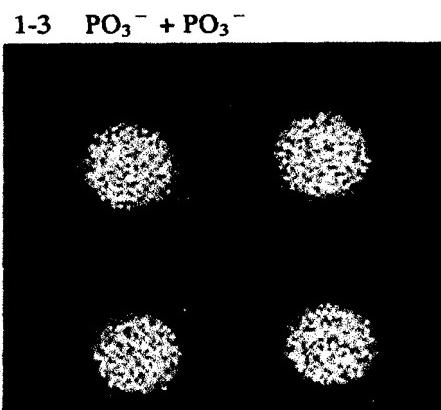
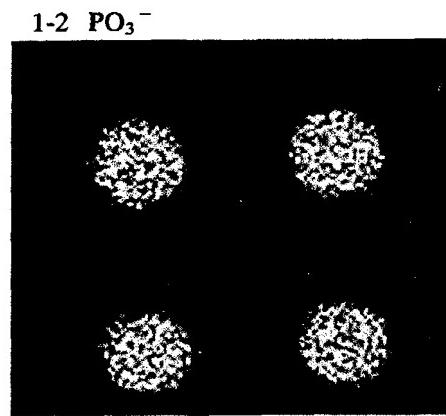
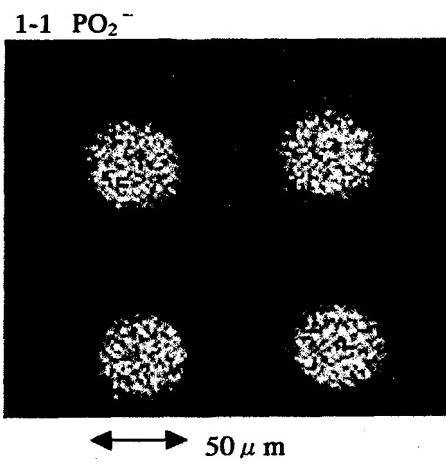
実施例2のイメージング結果を示す図であり、図1-1にPO₂⁻イオン、図1-2にPO₃⁻イオン、図1-3にPO₂⁻イオン+PO₃⁻イオン、図1-4に(チミン-H)⁻イオンに基づき再構成した二次元イメージを示す。

【図 2】

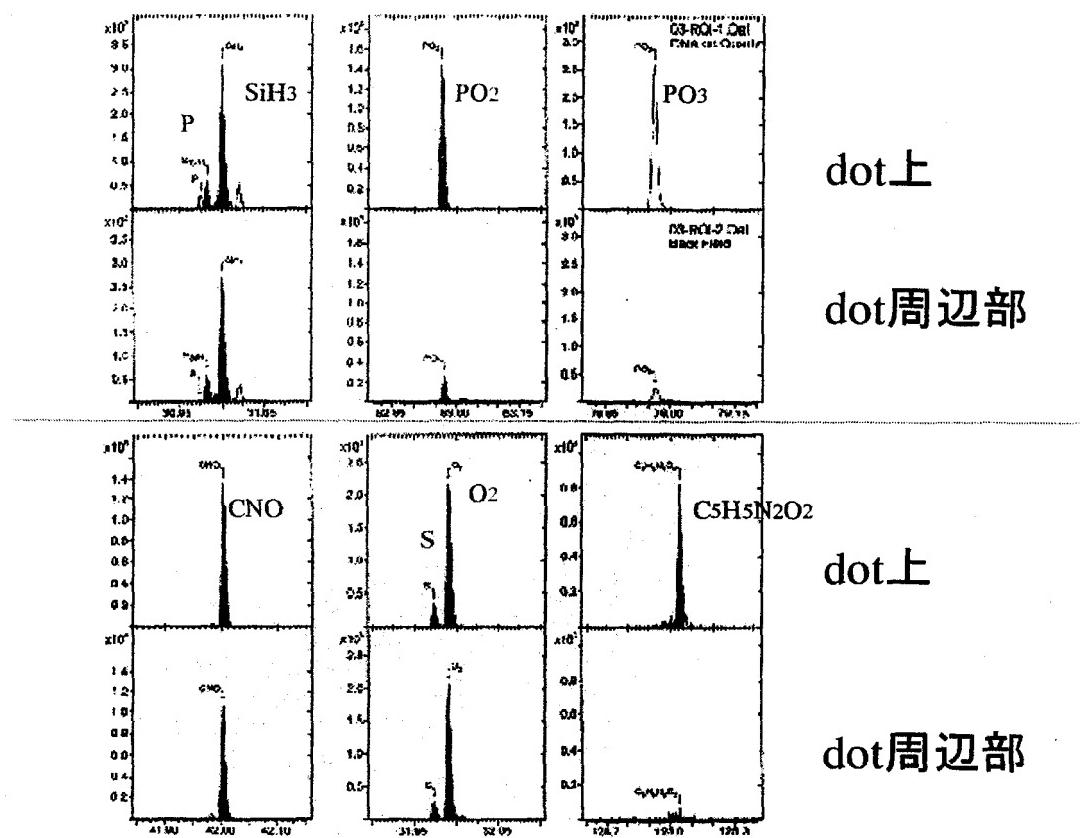
実施例2の組成分析結果において、利用したマススペクトルの結果を示す。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



dot上

dot周辺部

dot上

dot周辺部

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抵抗率が高い基板上に固定されている生体関連物質に関して、ある程度広い領域に関して、TOF-SIMS法を利用して、その二次元的な二次イオン測定画像を得る際、チャージアップの影響を抑制して、定量性の良好な二次元的な測定画像を得ることを可能とする測定方法を提供する。

【解決手段】 一次イオンビームをスポット照射する際、その照射スポットを、パルス的とし、さらに、非連続的なパターンで移行しつつ、二次イオン測定を進め、最終的に、前記非連続的なパターンに従って、二次イオン測定結果を二次元的なイメージ画像へと再構成することで、十分に高い位置分解能を有する二次元的なイメージ測定画像が得られる。

【選択図】 なし

特願2002-191208

出願人履歴情報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
氏名 キヤノン株式会社